



一种简化的细胞电泳装置

翟庆华

(北京市万明医院)

细胞电泳装置是通过测量细胞表面电荷以研究细胞功能及膜结构变化的仪器。由于技术的不断改进,细胞电泳技术已经用于临床实践,并初步证明在冠心病、血栓闭塞性脉管炎等疾病的诊断以及对祖国医学中瘀症的本质、活血化瘀的探讨上的实用价值。

在装置的改进中,梁子钧等创用的方形毛细管细胞电泳装置为国内的工作开展奠定了基础^[1]。但是,所用的电源、计时器等,仍被人们认为过于复杂而价昂;方形毛细管的制做也比较困难,不利于这项技术的推广。考察一下这项技术的全部细节,我们认为,复杂的稳压电源、计时器等并不是绝对必要的。本文叙述的,是我们在简化装置方面的一个尝试。

装置

一、带有同步计时器的稳压电源

稳压电源采用简单串联式晶体管稳压电路,直流输出32—58V连续可调。同步开关为KZJ-4型琴键式开关。计时器为BD-101型同步瞬间计时器,10毫秒/格。装好的仪器见图1。

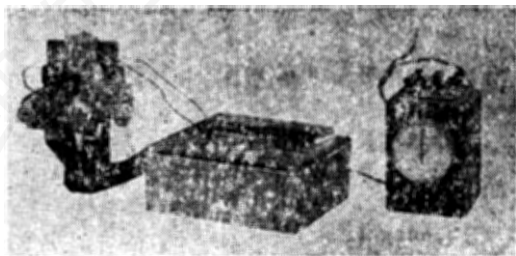


图1 仪器的外观

稳压电源面上的按钮自左至右分别为 K_1 、 K_2 、 K_3 、 K_4 , 旋钮左为电压调节 W_1 , 右为检流计灵敏度调节 W_2

二、电极

把铅笔芯一根等分为二,每段中间缠上两层纱布、蘸上融化了的石蜡,待凝,插入内径约3毫米、一端拉细的玻璃管中,两端露出铅芯约7毫米,封腊并接上导线(图2)。

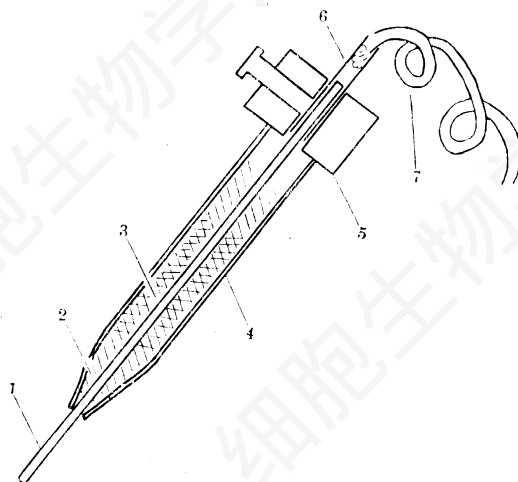


图2 电极的剖面图

1. 铅笔芯, 2. 固体石蜡, 3. 浸过石蜡的纱布, 4. 玻璃管, 5. 固定螺钉及螺母, 6. 铜片制成的小管, 7. 导线

三、观察小室

小室的装置与方形毛细管装置相似,为适用于圆柱形毛细管,做了如下改动:

1. 用圆柱形毛细管代替方形管。圆柱形毛细管直径约1毫米,长6厘米,由玻璃仪器厂购得,按以下标准筛选:直径0.7—1.3毫米;两端直径差不大于2%;两端直径平均值与中间直径之差不大于0.6%。

2. 去掉原固定架上的弹簧夹管器,在安放毛细管的小沟中、观察孔的两侧各放入一段直径约2毫米、弹性较好的塑料管,使放入小沟的毛细管上壁与固定架的上表面平。

3. 在毛细管的中段, 滴加一小滴氯化钙溶液, 在观察孔上盖上一片盖玻片。此时, 管上的氯化钙液滴即与盖玻片接触, 并将一段毛细管与盖玻片之间的缝隙弥合。(图3)

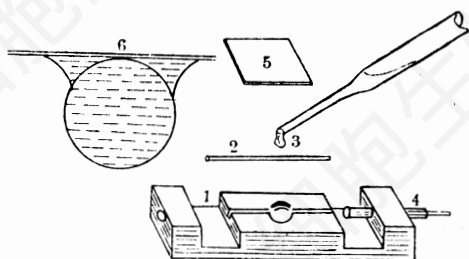


图3 观察小室的装置

1. 固定架, 2. 圆柱形毛细管, 3. 氯化钙液滴, 4. 电极封闭管, 5. 盖玻片, 6. 液滴弥合盖玻片——毛细管之间缝隙形成的观察平面

4. 显微镜

显微镜的微调节器应具有线性良好的精密刻度; 高倍物镜的像场弯曲应尽可能小且没有像畸变; 高低倍物镜的视场应有良好的同心性。

使用方法

一、电源的调整

1. 接通电源, 调整 W_1 , 至所需电压。
2. 把充满电泳介质的毛细管接入电路, 按下 K_1 , 检流计指针向左, 调整 W_2 至检流计指“30”左右。

二、细胞悬液的制备及毛细管的安装

血液用肝素抗凝, 分出血球, 悬于盐水或自家血浆中(红细胞 $1-2$ 万/毫米³) 充入毛细管, 按上述方法安装, 放在显微镜下, 用低倍物镜观察, 上下移动固定架, 使毛细管横贯视野中央, 换高倍物镜, 用微调节器调到测量层, 选好细胞, 即可进行电泳观察。

三、电泳观察

按下 K_1 , 使处在格右半部分的选定的细胞向左移动一格(此时计时器不计), 当移到测微尺的纵线时立即按下 K_3 , 使细胞继续移动两格(计时器计时)。照上述方法按动 K_2 及

K_4 , 使同一细胞向右移动同样距离。这样观察 10 个细胞, 既可消除泳动起始时惰性引起的误差, 又能把细胞泳动所耗时间自动累加。

四、电泳率的计算

按下式计算电泳率:

$$EPM = S/tU/L \quad (1)$$

式中, S —细胞泳动总程, μ ; t —泳动所耗的总时间, 秒; U —毛细管两端电压, V ; L —毛细管内液柱长度, cm 。一般, U 、 L 、 S 值固定, 若用 S' 表示 $S \frac{L}{U}$, 则式(1)将变为

$$EPM = S'/t \quad (2)$$

利用式(2), 计算工作将大为简化。

装置的性能及方法的探讨

一、电源、计时器及电极

细胞电泳所需电压不高、电流很小, 简单串联式晶体管稳压电源, 其容量及稳定性均符合要求。我们自制的稳压电源, 经计量所检定及两年多的连续使用, 证明性能良好, 输出电压调到 $45V$, 负载电流自 $0-1000$ 微安, 输出电压变化仅 $0.05V$; 使用中未发生过任何故障。

细胞电泳观察需要多次频繁走停地计时, 同步计时器是必要的。我们的计时器具有高精度、高同步性以及回零按钮, 使用方便。

铅笔芯做成的电极, 廉价易得, 尤其可取的是稳定, 即使长时间单向通电也未见极化现象。为探讨这种电极的使用效果, 我们把它与银电极做了比较, 用两种电极对同一红细胞悬液进行多次测量。结果(电泳时间: 银 67.17 ± 3.47 ; 铅笔芯 68.54 ± 1.73) 基本一致。

二、细胞显像畸变的纠正

细胞是否处在测量层上, 是通过对该层精细调焦后细胞的像是否清晰来判断的。圆柱形毛细管内的细胞, 显像严重畸变、模糊, 造成判断困难。为纠正这种畸变, 曾采用过多种措施, 如把观察面及照明面磨平, 制成外方内圆形管等。这些措施纠正了像的畸变, 但管的制

做却比较困难。我们试用折光液弥合盖片——毛细管外壁之间的缝隙,造成一个平面,来克服显像畸变,效果是好的。10%氯化钙溶液做折光液是合适的,它的折射率约为1.35,与血浆接近。此外,它还有不易产生结晶及容易洗净等优点。

三、静止层及其确定方法

早已发现,在外加电场的作用下,处在毛细管的不同深度的各层微粒的泳动速率是不同的。这是因为微粒受到电泳、电渗两种因素共同作用的结果。

单纯的电泳,通常使各层微粒以等速移向正极。电渗的情况却比较复杂。在外加电场的作用下,毛细管中的液体,沿管壁的一层,以较高的速度流向负极,越是远离管壁,液层的流速越低。管的两端是封闭的,管内的液体流动总量为零。因此,在同一时间中,有多少液体沿管壁流向负极,就必然有同量液体经中间流向正极。流速是逐层变化的,在两种流向之间存在着流速等于零的一层,即所谓静止层。处在这层的微粒,观察到的移动速率才等于电泳率。准确地确定电泳装置的静止层深度,是细胞电泳技术中最精细、最重要的一项工作。

根据理论推导,圆柱形毛细管的静止层处在0.71管半径处^[2](自管中心算起)。此处相当管直径的0.146(自管内壁算起)。在实际工作时,由于电泳介质折射率不同于空气而引起的深度视差(这种误差很大,遗憾的是,它被某些研究者忽视了,因而引起目前国内报道结果的较大差异)及显微镜微调罗旋的机械误差的存在^[3,4],准确地找到这一层是很不容易的。在静止层附近,深度——电泳率曲线的斜率很大,因此,只要在确定静止层时有小的误差,电泳率的误差就会很大。我们在工作中注意了以下几点:(1)规定了显微镜微调罗旋的使用段,并对该段刻度进行仔细校正。(2)根据悬浮介质的折射率,运用光折射定律计算并纠正显微镜深度测量上的视差。(3)在安装小室的过程中,细胞会因不可避免地下沉而离开

管壁一小段,由于我们是用靠近管壁的细胞层做为测量起始点的,因此,这层细胞与管壁的距离应该测出,并在计算测量层深度时加以扣除。此外,我们还测量并绘制了悬于自家血浆中的人红细胞的相对深度——电泳率曲线(图4),并建立了它的方程

$$y = -6.93(x^2 - x) + 0.148 \quad (3)$$

式中: y —电泳率, x —测量层的相对深度。这样,我们就可以选择曲线斜率不大的某一点做为测量层,根据式(3)算出测量层与静止层两电泳率的比值,利用这个比值把测量结果换算为静止层电泳率。

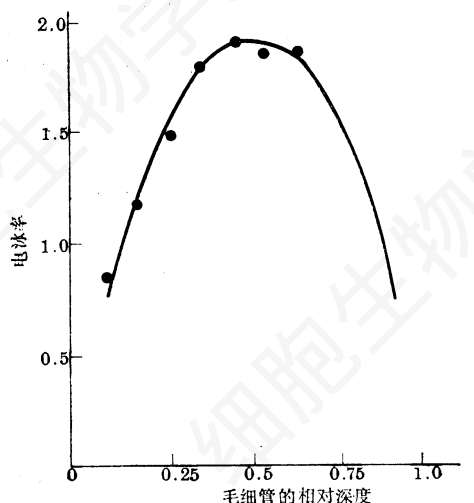


图4 悬于自家血浆的红细胞的深度——电泳率曲线

简化细胞电泳装置的实际应用

我们用这套装置和方法测量了悬于自家血浆中的15例健康人及77例血栓闭塞性脉管炎患者的红细胞电泳率,结果:健康人为 1.12 ± 0.072 ;患者为 0.95 ± 0.094 。

鉴于国内多采用正方形毛细管做观察小室,选用0.1“管直径”为测量层,我们也用类似梁子钧介绍的方法^[5]测量了不同直径毛细管的“静止层”深度,用直线回归法计算了毛细管直径与“静止层”深度的关系,其表达式为:

$$y = -13 + 0.124x \quad (4)$$

式中: y — “静止层”深度, μ ; x — 毛细管直径, μ ; 常数项(13)为靠近管壁的红细胞与管壁的距离, 为反映实际情况, 常数项是必要的。处在这一层上的红细胞的电泳率, 健康人为 0.875 ± 0.056 , 患者为 0.744 ± 0.073 , 与国内文献^[6,7] (电泳率是我们根据文献提供的条件算出的: 健康人 0.878 ± 0.067 ; 患者 0.794 ± 0.064) 结果一致。

应该说明, 式(4)的数值未按血浆的折射率进行几何光学校正; 校正后应为:

$$y = -11.2 + 0.1059x$$

小 结

1. 本文介绍了一套简化细胞电泳装置, 包括稳压电源、同步计时器及碳电极等, 结构简单、造价低、性能稳定可靠。

2. 用容易得到的圆柱形毛细管做观察小室, 用折光液弥合毛细管外壁——盖玻片之间的缝隙, 造成一个平面, 以纠正细胞显像畸变, 效果是好的。

3. 用本装置及方法测量了一批健康人及血栓闭塞性脉管炎患者的悬于自家血浆中的红

细胞电泳率, 结果分别为: 1.12 ± 0.072 ; 0.95 ± 0.094 , 两者差异非常显著($P < 0.001$), 与文献一致。

以上情况表明, 简化细胞电泳装置及方法是可用的; 合理的方法比复杂的设备更为重要。

参 考 文 献

- [1] 上海第一医学院: 细胞电泳, 1977, 20—23。
- [2] И. Н. Путилова: Руководство к Практическим занятиям по коллоидной химии, 中译本, 高等教育出版社, 1955, 150—151。
- [3] 田中克己: 显微镜の使い方, 中译本, 人民教育出版社, 1960, 113—114。
- [4] 施履吉: 定量组织学实验技术, 科学出版社, 1964, 102—106。
- [5] 上海第一医学院: 医用生物物理技术, (一) 1978, 26—27。
- [6] 李建明等: 血栓闭塞性脉管炎 100 例的血液流变学的观察, 中华医学杂志, 1980(12) 763。
- [7] 冯友贤等: 血管外科学, 上海科学技术出版社, 1980, 63: 219—220。

荧光漂白恢复动力学分析*

张 耀 远

(中国科学院上海细胞生物研究所)

一、 引 言

荧光漂白恢复测量技术(FPR), 作为测量处于微小系统中(如位于单个活细胞上)的经过荧光染色的分子、分子团块**等迁移率的有力工具而得到迅速发展。目前不少生物研究人员用 FPR 来测量细胞膜、脂质体中的分子迁移率等问题^[1], 这是因为细胞膜中分子的侧向运动反映了膜中分子的运动行为, 越来越得到人们的兴趣。我所也自行装备了荧光漂白恢复测量装置^[2], 并用此装置测定了人鼻咽癌细胞表面 ConA 受体的侧向扩散系数^[3]。本文对 FPR 技术的理论过程作一详细介绍, 从中导出膜中分子侧向迁移率所遵循的规律及定量分析的关系式。

* 顾国彦同志对本文提出了许多宝贵意见, 在此致谢。

** 以下简称被测物质。